



# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 機能性食品配料—高纖維米糠製品及幾丁寡糖之研究

計畫編號：NSC 89-2214-E-002-026

執行期限：88年8月1日至89年7月31日

主持人：蔣丙煌 教授 國立台灣大食品科技研究所

計畫參與人員：傅偉祥 國立台灣大食品科技研究所

### 一、中文摘要

利用米糠為原料來製造富含營養及機能性成分之食品配料，必需考慮以下幾個限制因子：(1)米糠含有大量之脂肪分解酶，易致使油脂氧化；(2)米糠含有大量的植酸，會影響礦物質之生體利用率；(3)米糠口之纖維素主要是水不溶性者，其顆粒較大，食感粗糙，適口性差。

本研究對米糠施予擠壓熱處理以安定之。經擠壓後產品之顏色變化不大，營養成分之損失亦輕(5%以下)。以溫度130°C以上及滯留時間20秒以上之擠壓條件處理之產品，於常溫貯存20天時，油脂酸價並無明顯升高，顯示具安定效果。

自米糠中將植酸脫除之最佳處理條件為以pH2.0之氫氯酸為溶劑，固液比為1:15，於常溫下萃取0.5小時，可萃出94%植酸，純度為30.5%。

以pH2 HCl溶液萃取米糠中植酸，將固液分離後以pH8.4-8.5 NaOH(6N)中和沈澱植酸鹽，再將濾液回添脫植酸之米糠中進行滾筒乾燥。此一程序可去除90%以上植酸，並可保留83-97%之維生素B。不會增加米糠中之鹽度，但會造成米糠醇近50%之損失。保留83-97%維生素B群，但是會造成米糠醇近50%之損失。

**關鍵詞：**米糠、植酸、米糠醇、機能性食品。

### Abstract

When the rice bran is used as raw material to manufacture a functional food ingredient, the following items should be considered: (1) the lipase in the bran may hydrolyze lipid and result in rancid flavor; (2) the phytic acid in the rice bran may affect the bioavailability of

minerals; and (3) the rice bran rich in insoluble fiber, its coarse texture will reduce the palatability of the product.

This research project used extrusion process to inactivate lipase, thus stabilize the rice bran. It was found that the color of the rice bran was not affected significantly due to extrusion. Less than 5% of the nutritional components lost during extrusion. When the rice bran was processed by extrusion at 130°C for 20 s, the extrudate could be stored at room temperature for at least 20 days without developing rancidity.

The phytic acid in rice bran was most easily removed by extraction. The extracting solvent was hydrochloric acid solution at pH 2.0; solvent / solid ratio was 15/1, and extracting times was 30 min. Under the above conditions, more than 94% phytic acid with 30.5% purity could be extracted from the extruded rice bran at room temperature.

The extract was neutralized using 6N NaOH solution to precipitate phytate. The supernatant which contained the nutrients being extracted by hydrochloric acid solution was added back to the rice bran solid to replenish the nutritional quality of the product. Drum drying was then used to remove excessive water to obtain a dried powdered product. The process removed more than 90% phytic acid, retained 83-97% B vitamins, but nearly 50% of oryzanol was lost.

**Keywords:** rice bran, phytic acid, oryzanol, functional food

### 二、緣由與目的

臺灣年產糙米量 152 萬公噸，其產量與產值皆是臺灣最大宗農作物，糙米碾白時產生 10% 米糠，為碾米之副產品，含油量近似黃豆，但僅有 11% 利用於提煉米糠油。米糠富含營養物質，但因內含大量植酸及水不溶性纖維素等不適直接食用之物質，故大部份作為飼料、肥料及土壤改良劑，甚至當廢棄物處理，實是可惜。如能利用米糠為原料製造具機能性之食品或食品配料，則可提高米糠利用價值。

利用米糠為原料來製造富含營養及機能性成分之食品配料，必需考慮以下幾個限制因子：①米糠含有大量之脂肪分解酶，易致使油脂氧化；②米糠含有大量的植酸，會影響礦物質之生體利用率；③米糠中之纖維素主要是水不溶性者，其顆粒較大，食感粗糙，適口性差。

本計劃即針對上述問題，研究如何利用適當的加工程序將米糠轉化為高價值之食品配料。本研究即以擠壓處理來破壞脂肪分解酶，以酸性溶液萃取法或酵素水解法去除植酸，利用物理或化學方法試圖將部分不溶性纖維轉化成水溶性纖維，但是所有的加工步驟皆需考慮到米糠中營養及機能性成份的保留。

### 三、結果與討論

#### 一、米糠之安定及脫儲植酸之研究

##### (一)、水份含量之變化

隨滯留時間越短，經擠壓之米糠產品，所含水分含量越少，滯留時間短時，螺軸轉速快，所造成擠壓膨發現象亦較明顯。由於膨發時，會伴隨有高溫之水蒸汽散發，造成水分含量之降低。米糠中約有 50% 水分因擠壓而喪失。實驗中亦發現滯留時間愈長，造成米糠顆粒間緊密擠壓，且在高溫作用下，會使米糠所含油脂經擠壓而滲出，故於擠壓米糠產品之外表會有油滴滲出現象。

##### (二)、色澤之變化

經擠壓後之米糠較原料米糠之 L 值變小，顯示亮度減少，b 及  $\Delta E$  值則無顯著之變化 ( $p < 0.05$ )。顯示其顏色變暗，但顏色不受溫度影響。

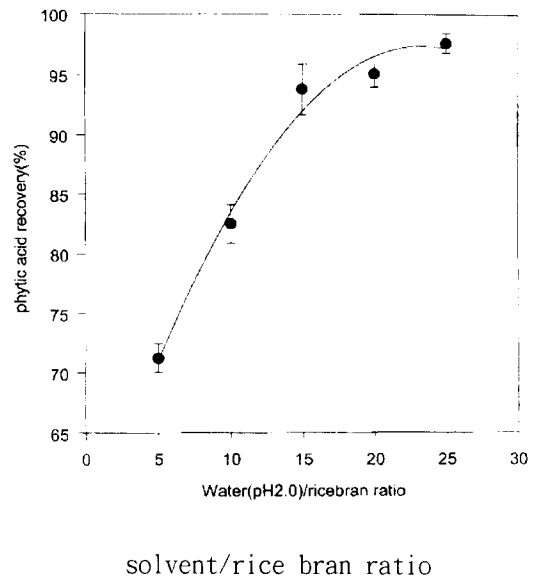
##### (三)、擠壓米糠之貯存安定性

擠壓溫度在  $130^{\circ}\text{C}$  以上，滯留時間在 20 秒以上時之擠壓處理米糠產品，經 20 天常

溫貯放，其酸價變化量並無明顯差異，顯示以  $130^{\circ}\text{C}$  以上，處理時間 20 秒，即可使米糠達到安定效果。

#### (四)、經擠壓處理之米糠以酸溶液脫除植酸之效果

於米糠中加入 pH 為 2 之氫氯酸溶液，以各種米糠/溶劑比混合 (米糠/溶劑比: 1/5、1/10、1/15、1/20、1/25)，於  $25^{\circ}\text{C}$  下萃取 30 分鐘，以 270mesh 及 400mesh 篩網過濾，所得濾液測其植酸含量結果如圖一所示。得知固液比例增加時，其植酸萃取回收率增高，惟萃取出之植酸液中雜質相對增高。考量植酸脫除量及萃出液中之植酸純度，所擇取之固液比為米糠: 氫氯酸液為 1:15。於此一條件下植酸萃出率可達 94%，萃出之植酸純度達 30.5%。



圖一、以 pH 2 之氫氯酸溶液為溶劑萃取米糠中植酸時，不同溶劑/米糠比對植酸之萃取率變化影響

另外，由實驗結果發現，擠壓加工滯留時間越長，植酸之萃取率愈低，顯示較長時間之擠壓處理，會使得米糠中組成份與植酸形成更緊密複合物，而影響了植酸之萃取。推測擠壓滯留時間長，植酸與米糠中蛋白質、澱粉、纖維反應時間充分，形成不易萃取之複合物。擠壓處理 20 秒以上時，擠壓處理溫度愈高，植酸萃取量增加，推測溫度愈高造成與植酸結合之蛋白質變性及澱粉糊化，使植酸易於解離脫除。惟至  $130^{\circ}\text{C}$  以上，植酸萃取率微減少。依據 Andersson 等(1980)及馬(1992)研究發現高溫擠壓處理時，會造

成植酸破壞，且隨溫度增加而增加，推測本實驗在 130°C 以上時造成植酸萃取率下降之因素來自植酸破壞。在擠壓處理時間 20-30 秒時，其萃取液之固形物含量最少，而隨擠壓處理時間增加，萃取液中之固形物含量隨之增加。顯示時間增加，米糠組成分易裂解而易溶於水，如此不但對於保存米糠機能性成份具有影響，而且增加未來植酸純化之困難度。

(五)、營養成份的變化：

米糠經擠壓 (130°C, 20 秒) 後，其營養物質受熱變化不大(表一)，維生素 B<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> 損失率 5-8%，菸鹼酸幾無損失，而米糠醇則僅有 3% 損失。以擠壓方式來安定米糠對米糠中營養成份並無太大影響。

表一、米糠經擠壓處理後之營養物質之變化

營養成份	安定米糠(130°C, 20 秒擠壓) 保留率(%)
Niacin	99.15
Vitamin B <sub>2</sub>	91.27
Vitamin B <sub>1</sub>	94.30
Oryzanol	97.10

註：保留率係由擠壓處理前後比較計算而得

二、營養及機能性成份之米糠食品配料之研究

(一)、滾筒乾燥處理對米糠組成分之影響

利用 pH 2 鹽酸溶液為溶劑，萃取時間 0.5 小時，操作溫度 25°C，米糠/溶劑比例為 1:15，可萃出米糠中 94% 植酸。再以氫氧化鈉溶液(6N)與萃取液中植酸反應形成植酸鹽，過濾去除植酸鹽，將濾液回添至脫除植酸之米糠中。如此雖然可以保留米糠之營養及機能性成分，但是也會增加水分含量，因此需要後續之乾燥處理。本實驗以雙滾筒乾燥法將脫植酸米糠乾燥至水分含量 10%。經乾燥後之米糠主要成份變化如表二。

表二、米糠處理後之成份變化表

成份變化	米糠	米糠安定處理(130°C, 20 秒)	脫除植酸之滾筒乾燥處理(123-130°C, 5.3 秒)
Niacin 保留率(%)	100	99.15a	97.21a
Vitamin B <sub>2</sub> 保留率(%)	100	91.27b	83.30b
Vitamin B <sub>1</sub>			

保留率(%)	100	94.30a	91.23a
Oryzanol 保留率(%)	100	97.10a	52.55b
IDF(%)	24.50b	25.43a	23.86c
SDF(%)	5.53a	5.03b	4.37c

(abc, P<0.05)

由表二中得知，米糠經擠壓安定化處理後，其營養物質受熱破壞不大，僅維生素 B<sub>2</sub> 損失達 8.8% 為較高者，再經酸萃取植酸後，將濾液回添米糠渣中以滾筒乾燥處理，則米糠醇有顯著的損失，損失率近 50%，依據 Yoon 等 (1994) 研究在米油精製過程之鹼處理 (alkali-refined) 時有 51% 米糠醇被破壞，1991 年雷等研究顯示米糠醇易受鹼及熱破壞，故推測滾筒乾燥前之鹼中和及乾燥之高溫會造成米糠醇之破壞。而維生素 B 群之損失率僅為 3-17%。顯示此加工程序對維生素 B 群破壞不大。

米糠中具有 24.50% IDF(水不溶性膳食纖維)及 5.53% SDF(水溶性膳食纖維)，而具機能性之多醣體( $\alpha$ -glucan)為 SDF，實驗結果顯示，擠壓處理後 IDF 有 4% 增加，並無法使 IDF 轉變成 SDF，據 1984 年 Varo 等研究澱粉在高水分下，經過熱處理，形成不定形(amorphous)的網狀結構，冷卻後老化生成結晶，此種形態的澱粉無法被酵素分解，稱為抗解澱粉(resistant starch)，Englyst 等 (1983) 製造 corn flake 時亦產生抗解澱粉，故推測實驗結果 IDF 之增加來自澱粉經熱處理轉化為抗解澱粉所造成。經脫植酸處理後再滾筒乾燥，使得部份 IDF 水解流失(1.7%)。而具有機能性之多醣體，會隨著擠壓處理而減少(9%)，再經脫植酸作用，則有 21% 水溶性膳食纖維損失。顯示米糠脫植酸及乾燥之步驟，將造成 50% 米糠醇及 21% 水溶性多醣體的流失。

(二)、米糠經滾筒乾燥處理之 pH 值及鹽度影響

米糠處理 \ pH \ 鹽度	pH 值(米糠水溶液) *2	鹽度(%)
新鮮米糠	6.78a	0.52a
擠壓安定米糠	6.68a	0.53a
滾筒乾燥米糠	6.39a	0.53a

p<0.05

\*\*1. 鹽度以 Sinar saltmeter 分析

\*2. 10% 米糠水溶液

植酸萃取液為酸性 (pH 2.0)，經氫氧化鈉中和沈澱過濾植酸鹽。再將濾液回添脫植酸之米糠中進行滾筒乾燥，惟酸鹼中和會

形成鹽類而出現於產品中。由表三顯示之實驗結果得知萃取植酸鹽過程，選用 pH8.4-8.5 NaOH (6N)中和沈澱植酸鹽並不會增加乾燥產品之鹽度，可見酸鹼中和形成之鹽類幾乎完全是植酸鹽，在過濾時會被去除 不會殘留於滾筒乾燥之米糠中，因此也不會對所開發之米糠食品配料造成問題。

### (三)、產品顆粒大小對物性之影響

由預備實驗得知機械力處理可有效改變米糠特性，故本實驗將滾筒乾燥米糠加以磨粉，篩分成不同粒徑，各區分之特性如(表四)所示：

表四、米糠經磨粉成不同大小顆粒之可溶性固形物量(%)

米糠顆粒 (mesh)	可溶性固形物量 (%)
60-100	37.22± 0.59b
100-150	32.44± 0.01a
150-200	39.83± 0.67b
200-250	37.04± 0.15b
250-325	38.63± 0.29b
>325-	45.64± 0.47c

P<0.05

米糠經脫植酸及滾筒乾燥，之可溶性固形物量由 12.42%增加至 35.02%。推測米糠經酸處理脫除植酸時，同時會分解米糠中部分大分子成份，在滾筒乾燥時，米糠中澱粉也會糊化而增加其水溶性成份量如再經 30 分鐘研磨則可再增加至 38.51% (米糠顆粒平均) 表四。

### 四、計畫結果自評

經由本研究得知安定米糠並且保持米糠營養物質之最佳處理條件為以雙軸擠壓方式，以 130°C，20 秒處理，其營養物質損失可降至 5%以下。米糠中之植酸則應以 pH 2 以下之氫氯酸萃取。將萃取液中和後分離出植酸鹽，並將濾液回添脫植酸之米糠之中進行滾筒乾燥，可有效保留米糠營養物質，且不會增加米糠鹽度，但會造成米糠醇之損失。

雖然本研究初步建立了利用米糠製造一具機能性之食品配料的製程。但是，使用酸液脫除植酸的流程稍嫌繁複，又會造成營養成份，尤其是米糠醇的損失。因此，後續之研究應該設法改良此一製程。初步的構想是利用稻米或其他植物種子中原本即含有之植酸酶來水解植酸，而此一想法是否可行仍有

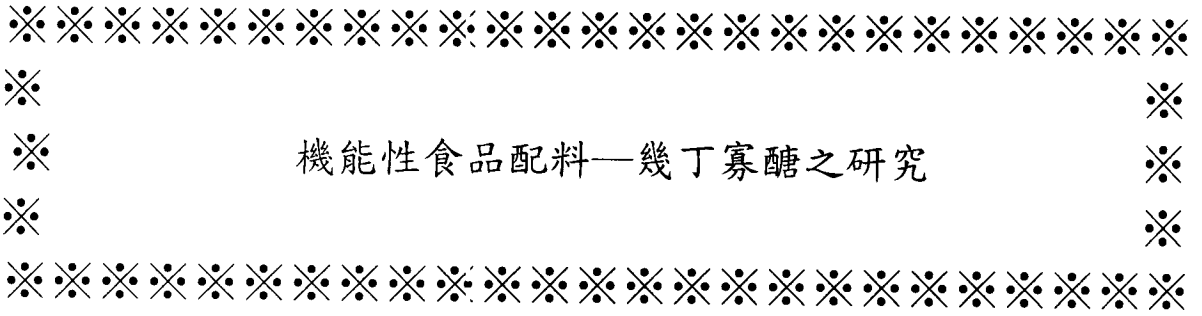
待實驗證明。

### 五、參考文獻

- 邱紫文，蘇矢宏，虞士貞、呂正義。1994。臺灣區稻米米麩中水溶非澱粉性多醣之分離與鑑定。83 年米穀類加工產品技術之研究成果彙編 pp. 87-101。(農委會)。
- 邱紫文，虞士貞，邱紫怡，黃乾吉，楊啟春。1995。米糠之水溶非澱粉性多醣之萃取。84 年米穀類加工產品技術之研究成果彙編， pp 245-261(農委會)。
- 李慧芳。1994。米糠於貯藏期間劣化之研究。靜宜大學碩士論文。
- 何明根。1984。台灣發展米糠油工業可行性之研究。先鋒企業管理發展中心出版(台北)。
- 馬永正。1992。擠壓加工製備鈣鐵營養強化米製品之研究。臺灣大學碩士論文。
- 許立峰。1989。穀類食物纖維及其在食品上之應用。食品工業 21(3):33-38。
- 黃偉儀。1992。食米在擠壓加工中成分物質之變化暨其與產品香味、顏色之關係。臺灣大學碩士論文。
- 陳淑霞。1983。米糠的利用。食品工業 15(6): 25-30。
- 陳賢哲。1982。植酸及肌醇的製造應用。食品工業 14(2): 23-27。
- 陳恒宏。1993。植酸的簡介。食品工業 25(8): 13-20。
- 張永欣。1990。水溶性食物纖維在食品方面地利用。食品工業 22(2): 46-51。
- 張壽昌，黃俊雄。1983。米糠擠壓造粒提油之研究。食品工業發展研究所，研究報告第 290 號。
- 黃俊雄，張壽昌。1983。米糠擠壓造粒提油之示範推廣試驗。食品工業發展研究所，研究報告第 293 號。
- 廖鋸賢，黃俊雄，彭冠玉，謝定時。1985。米糠擠壓提油精製商業化生產之評估試驗。食品發展研究所，研究報告第 273 號。
- 蔡敬民，丁海惠，王麗娟，林子清。1992。米糠對人體血脂肪之影響。中國農業化學會誌 30(4): 484-495。
- 蔡佳原。1994。米穀粉在擠壓時流變性質與產品物性關係之研究。台灣大學碩士論文。
- Aoe, S.; Oda, T.; Tatsumi, K.; Yamauch, M. and Ayano, Y. 1993. Extraction of soluble dietary fibers defatted rice bran. Cereal Chem. 70(4): 423-425.
- Bhattacharyya, A. C.; Majumdar, S. and Bhattacharyya, D. K. 1986. Edible quality ricebran oil from high FFA rice bran oil by miscella refining. JAOCS, 63(9): 1189-1191.
- Carroll, L. E. 1990. Functional properties and applications of stabilized rice bran in akery products. Food Tech. 1990(4): 74-76.
- Cheryan, M. 1980. Phytic acid interactions in food systems. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.

- 13: 297-335.
- Diack, M. and Saska, M. 1994. Separation of vitamin E and  $\gamma$ -oryzanols from rice bran by normal-phase chromatography. *JAOCS*, 71(11): 1211-1217.
- Fellers, D. A. 1991. Rice bran stabilization and recovery of edible oil-technical and financial feasibility. *Food Reviews Inter.*, 7(4): 445-483.
- Fredlund, K.; Asp, N. G.; Larsson, M.; Marklinder, I. and Sandberg, A. S. 1997. Phytate reduction in whole grains of wheat, rye, barley and oat after hydrothermal treatment. *J. Cereal Sci.*, 25(1997): 83-91.
- Gnunasumbandam R. and Hettiarachy, W. S. 1995. Protein concentrates from unstabilized and stabilized rice bran: preparation and properties. *J. Food Sci.*, 6(5): 1066-1069.
- Hammond, N. 1994. Functional and nutritional characteristics of rice bran extracts. *Cereal Food World*, 39(10): 752-755.
- Krishna, A. G. G. 1993. Influence of viscosity on wax setting and refining loss in rice bran oil. *JAOCS*, 70(9): 895-897.
- James, C. and Sloan, S. 1984. Functional properties of edible rice bran in model systems. *J. Food Sci.* 49: 310-311.
- Julino, B. O. and Hlicks, P. A. 1996. Rice functional properties and rice food products. *Food Rev. Int.*, 12(1): 71-103.
- Kahlon, T. S.; Chow, F. I. and Sarye, R. N. 1994. Cholesterol-Lowering properties of rice bran. *Cereal Food World*, 39(2): 99-103.
- Kim, C. J.; Byun, S. M.; Cheigh, H. S. and Kwon, T. W. 1987. Optimization of extrusion rice bran stabilization process. *J. Food Sci.* 52(5): 1355-1358.
- Lehrfeld, J. 1989. High-performance liquid chromatography analysis of phytic acid on a pH-stable, macroporous polymer column. *Cereal Chem.* 66(6): 510-515.
- Maga, J. A. 1982. Phytate: Its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. *J. Agric. and Food Chem.* 30(1): 1-9.
- Plaami, S. P. 1997. Content of dietary fiber in foods and its physiological effects. *Food Rev. Int.*, 13(1): 29-76.
- Randall, J. M.; Sayre, R. N.; Schultz, W. G.; Fong, R. Y.; Mossman, A. P.; Tibelhorn, R. E. and Saunders, R. M. 1985. Rice bean stabilization by extrusion cooking for extraction of edible oil. *J. Food Sci.* 50: 361-364.
- Sandberg, A. S. and Svanberg, U. 1991. Phytate hydrolysis by phytase in cereals; effect on in vitro estimation of iron availability. *J. Food Sci.* 56(5): 1330-1333.
- Saunders, R. M. 1990. The properties of rice bean as a foodstuff. *Cereal Food World*, 35(7): 632-636.
- Sayre, R. N.; Earl, L.; Kratzer, F. H. and Saunders, R. M. 1988. Effect of diets containing raw and extrusion-cooked rice bran on growth and efficiency of food utilisation of broilers. *British Poultry Sci.* 29: 815-823.
- Sreenarayanan, V. V. and Chattopadhyay, P. K. 1986. Rice bran stabilization by dielectric heating. *J. Food Pro. & Pres.* 10: 89-98.
- Torre, M. and Rodriguez, A. R. 1991. Effect of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *CRC Food Sci. & Nutri.* 1(1): 1-22.
- Wood, P. J.; Weisz, J. and Blackwell, B. A. 1991. Molecular characterization of cereal  $\beta$ -D-glucans. Structural analysis of oat  $\beta$ -D-glucan and rapid structural evaluation of  $\beta$ -D-glucans from different sources by high-performance liquid chromatography of oligosaccharides released by lichenase. *Cereal Chem.* 68(1): 31-39.
- Yoon, S. H. and Kim, S. K. 1994. Oxidative stability of high-fatty acid rice bran oil at different stages of refining. *JAOCS*, 71(12): 227-229.
- Zhou, J. R. and Erdman, J. W. 1995. Phytic acid in health and disease. *CRC Food Sci. & Nutri.* 35(6): 495-508.

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告



## 機能性食品配料—幾丁寡糖之研究

計畫類別：  個別型計畫       整合型計畫

計畫編號：NSC89--2214-E-002-026

執行期間： 88年 08月 01日至 89年 07月 31日

計畫主持人：蔣丙煌 教授

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立台灣大學食品科技研究所

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 機能性食品配料—幾丁寡糖之研究

計畫編號：NSC 89-2214-E-002-026

執行期限：88年8月1日至89年7月31日

主持人：蔣丙煌 教授 國立台灣大食品科技研究所

計畫參與人員：郭家宏 國立台灣大食品科技研究所

### 一、中文摘要

本研究利用 *Bacillus cereus* NTU-FC-4 生產之粗酵素於膜反應器水解幾丁聚糖生產幾丁寡糖。

研究結果顯示 *Bacillus cereus* NTU-FC-4 生產的粗酵素對於去乙酰度 60 % 的幾丁聚糖有較高的活性，最適溫度為 55 – 60 °C，最適 pH 為 5。

在膜反應器方面，產能隨著酵素/受質比的增加而增加，隨著滯留時間的增加而減少。當體積替換數高於 2.5 時，連續式酵素反應器的產能開始高於批式，且隨著體積替換數的增加，連續式與批式在產能上的差距也越大。利用膜反應器，在酵素/受質比為 0.1 – 0.2 (unit/mg)，固定操作壓力下長期操作 15 小時，透液中的產物濃度可保持穩定，而以寡糖定義的轉化率則幾乎可達 100 %。

以 *Bacillus cereus* NTU-FC-4 生產的粗酵素之主要水解產物為三糖和四糖。在膜反應器中，隨著酵素濃度的增加，五糖、六糖有減少的趨勢。在低酵素濃度下，隨著受質濃度的增加，五糖、六糖有增加的趨勢，但在高酵素濃度下，受質濃度對於生產五糖、六糖的影響則不顯著。在反應體積為 500 ml、透沱率為 5 ml/min 條件下，酵素/受質比為 0.1 (unit/mg) 時，有較高量的五糖、六糖生成，且有較高的寡糖轉化率。與批式反應器比較時發現，連續式反應器之水解產物較批式反應器者有較高的四糖、五糖與六糖含量。因此推斷，粗酵素最初是以亂切的方式降解幾丁聚糖，此時形成高於三糖的寡糖，最後再將其快速水解。在膜反應器中，由於產物不斷移出系統，故其高等寡糖含量比批式反應器高。當三糖與四糖濃度分別高於 40 % 與 30 % 時，有逆反應發生，而生成分子量更高的寡糖。

關鍵詞：幾丁質、幾丁寡糖、膜反應系統

### Abstract

The goal of this research use the crude enzyme from *Bacillus cereus* NTU-FC-4, to hydrolyze chitosan to produce chito-oligosaccharides in a membrane reactor. It was found that the crude enzyme was more active for 60%-deacetylated chitosan. The optimum temperature was 55-60 °C, and optimum pH was 5. During hydrolysis in the membrane reactor, The system had a higher productivity when operated at a higher E/S ratio or lower residence time. When the volume replacement exceeded 2.5, the productivity of the membrane reactor became higher than that of the batch reactor, and the difference between them became even greater when the volume replacements was further increased. The membrane reactor could be operated at E/S ratio of 0.1 – 0.2 (unit/mg) and a constant pressure for 15 hr, and stilled maintained a stable product composition. The substrate conversion determined by the oligosaccharides content was nearly 100 %.

The hydrolysate of the crude enzyme from *Bacillus cereus* NTU-FC-4 were mainly chitotriose and chitotetraose. During the membrane reactor operation, the content of chitopentaose and chitohexaose in the product decreased when the enzyme concentration was increased. At low enzyme concentration, the content of chitopentaose and chitohexaose in the product tended to increase when substrate concentration was increased. However, the substrate concentration had no significant effect on the chitopentaose and chitohexaose contents at high enzyme concentration. When the system was operated at E/S ratio 0.1 (unit/mg), reactor



volume 500 ml and flux 5 ml/min, the process had the highest conversion and the product contained the highest amount of chitopentaose and chitohexaose. In general, the membrane reactor produced more chitotetraose, chitopentaose and chitohexaose than that of batch reactor. We suspected that The enzyme hydrolyzed chitosan into GlcN-oligomers above (GlcN)<sub>3</sub> in a random-splitting manner in the initial cleavage, then hydrolyzed oligomers rapidly in the final cleavage. In the membrane reactor, the hydrolyzed product was continuous removed from system, thus produced more higher oligomers. Chitotriose and chitotetraose converted to higher molecular weight oligosaccharides when their contents were higher than 40 % and 30%, respectively, due to the reversed reaction.

**Keywords:** chitosan , chitooligosaccharides, membrane reactor

## 二、緣由與目的

蝦類為我國水產加工業重要原料之一，而蝦殼約佔全蝦重之 60 ~ 80 % ( Bough, 1975 )，故每年均產生為數不少之蝦殼廢棄物。以往這些廢棄物都是直接丟棄而造成環境污染。亦有部分蝦殼用來加工製造成魚粉及魚飼料，但其經濟效用不高。若能加以利用製造高價值的產品，不僅能解決廢棄物問題，又能增加經濟價值。蝦殼廢棄物經適當的分離純化後，約可得到 20 ~ 30 % 的幾丁質類物質 ( Bough, 1975 )。利用蝦殼廢棄物製備幾丁質、幾丁聚醣，並進一步將其分解而製成幾丁寡醣及其他衍生物，可以提高蝦殼廢棄物的利用價值。

以  $\beta$ -1,4 D-葡萄糖胺鍵結而成的幾丁寡醣是由幾丁聚醣經化學水解或酵素水解反應而得，具有生理活性，可應用於食品、醫藥、以及植物栽培等方面。

目前製造幾丁寡醣的方法有酸水解法及酵素水解法，但是酸水解需要使用高溫及大量的酸，會造成環境污染及能源的消耗，且產物大多為單醣。雖然以酵素水解法生產幾丁寡醣為較佳之方法，但是目前大部分均使用批式進行酵素水解，因而有以下之缺點：酵素需求量大；成本較高；不易控制反應程度以及水解產

物之均一性；產量低；反應完成後需要以調整酸鹼度或加溫以停止反應，增加了加工步驟與成本，並會使產物產生嚴重的褐變現象。

由於幾丁聚醣酶價格昂貴，所以本實驗自行培養微生物並生產粗酵素水解幾丁聚醣。所用之菌種為 *Bacillus cereus* NTU-FC-4，乃台灣大學農業化學系李敏雄老師實驗室所提供，此菌株由洪(1994)自土壤中篩選出，可生產幾丁質酶及幾丁聚醣酶，具有相當高的活性，其最適 pH 在幾丁聚醣可溶的範圍，故選擇此菌株生產之酵素供實驗之用。

本研究擬利用膜反應器水解幾丁聚醣生產幾丁寡醣。此法可連續生產幾丁寡醣，為一較有效的加工方式。本研究之重點在於探討利用膜反應器生產幾丁寡醣的操作因子，以酵素濃度、受質濃度、透流率與反應器體積當主要操作變因，探討其對於產率、轉化率、操作容量及產物之分子量分佈的影響，並與常用之批式反應器比較，試圖建立一套新的幾丁寡醣生產系統模式。

## 三、結果與討論

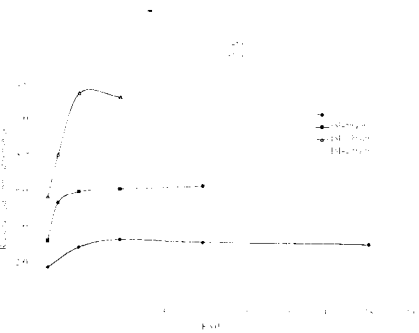
### 一、粗酵素性質的探討

本研究首先檢測丙酮沉澱酵素對幾丁質及幾丁聚醣以外之其它多醣聚醣類是否也有活性。由於在膜反應器中受質需為溶解狀態，因此，本研究主要以溶解狀態的幾丁聚醣作為測定活性的受質。溶解狀態的幾丁聚醣是直接取結晶狀的幾丁聚醣以 0.2 M pH 5 醋酸緩衝液溶解，結果發現由於 *Bacillus cereus* NTU-FC-4 生產的粗酵素含幾丁質酶及幾丁聚醣酶，因此對於去乙酰度較低的溶解狀幾丁聚醣有較高的活性，以去乙酰度 60% 的幾丁聚醣為受質時活性最高。研究結果同時顯示粗酵素最適溫度為 55 - 60 °C。並且在 40 °C 及 45 °C 下保溫 2 小時後仍有相當高的活性；於 50 °C、55 °C 及 60 °C 則在保溫兩小時後有活性下降的趨勢，其中於 60 °C 下活性隨著保溫時間拉長而有顯著的下降情形，但於 2 小時後仍保有 58% 的活性。幾丁聚醣溶液添加 0.2 M pH 4、pH 5 及 pH 6 的醋酸緩衝溶液仍為溶解狀態，而添加 pH 6 或以上的磷酸緩衝液及其他緩衝液時，則為膠態狀。粗酵素的最適 pH 在 5 ~ 6 之間。由於粗酵素對於溶解態的幾丁聚醣表現的活性較膠態為高，在 pH 6 的磷酸緩衝液中幾丁聚醣會呈膠態狀，因此粗酵素的活性遠低於在 pH 6 的醋酸緩衝液。在磷酸緩衝液中的

活性以 pH 7 最高。由於實驗時是將酵素溶解在 pH 4 ~ 6 醋酸緩衝液及 pH 7 ~ 9 磷酸緩衝液中，於 40 °C 下，分別放置 1 小時及 24 小時後，再將其加入溶於 pH 5 的醋酸緩衝液之幾丁聚糖溶液中測活性，因此幾丁聚糖不會因緩衝溶液的影響而呈膠態，所以測得的活性結果與酵素的最適 pH 不同。結果顯示，酵素置於緩衝液 1 小時後，以 pH 7 有較高的活性。在 pH 穩定性方面，置於 pH 5、pH 8 和 pH 9 的緩衝液中 24 小時後，其活性仍相當安定。

## 二、影響連續式膜反應器操作因子之探討

酵素與受質濃度組合的效應對於產物濃度的關係如圖一所示。圖中還原糖濃度是以系統到達穩態時，透流液中還原

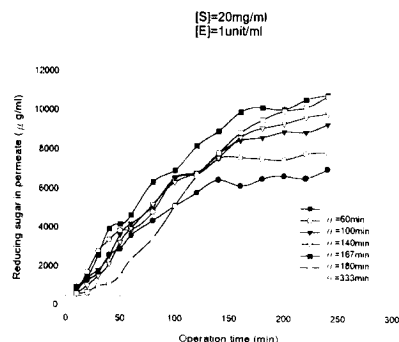


圖一、受質濃度在不同酵素/受質比下對透流液中還原糖濃度的影響

Fig.1 Effect of enzyme/substrate ratio on the product output using various substrate concentrations in the membrane reactor after 4 hours.

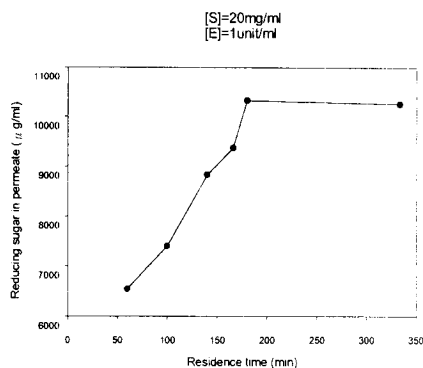
糖濃度來計算。由圖中可看出 E/S 比越大時，透流液中還原糖濃度越高，但在 E/S 比大於 0.1 以上，還原糖濃度則沒有增加的現象。當 E/S 比較大時表示反應器中酵素濃度比較高，因此受質的轉化率也較高，但是更高量的酵素添加對受質轉化率的提高幫助不大，且增加酵素成本；當 E/S 比較小時，則會有受質累積於反應槽中的現象發生，造成操作壓力的升高，使得能操作的時間縮短。以長期操作的觀點而言，其較佳的 E/S 比值是在 0.1 到 0.2 之間。於相同之 E/S 比值下，增加受質濃度可增加透流液中還原糖之濃度。平均滯留時間定義為反應器體積除以透流率(residence time  $\theta = V/J$ )，其與透流液中還原糖濃度關係如圖二所示。滯留時間增加會使透流液中還原糖濃度增加，當滯留時間由 60 min 增加到 180 min 時，透流液中還原糖濃度有明顯增加的趨勢，隨著滯留時間的增加，系統到達穩定狀態所需

的時間增加。圖三顯示滯留時間對透流液中產物濃度的影響。圖中還原糖濃度是以系統到達穩態時，透流液中還原糖濃度來計算。當滯留時間大於 180min 時，透流液中還原糖濃度沒有增加的現象，因此當操作件為受質濃度 20 mg/ml；酵素濃度 1 U/ml 時，較適的滯留時間為 180 min。當滯留時間高於 180 min 時，以增加反應體積或是減低透流率來增加滯留時間對透流液中產物濃度的增加有限，且會降低產率。



圖二 滯留時間對透流液中還原糖濃度的影響

Fig. 2 Effect of residence time on the product output in the membrane reactor. Operating condition: S=20 mg/ml ; E=1 unit/ml.



圖三 操作四小時後滯留時間對透流液中還原糖濃度的影響

Fig 3 Effect of residence time on the product output in the membrane reactor after 4 hours. Operating condition: S=20 mg/ml ; E=1 unit/ml.

產能(productivity)，為單位酵素所能生產的水解產物質量，這個參數常被用來比較批次與連續式反應器的差異。連續式膜反應器的產能以下式表示：

$$P_{UF} = \frac{\int P_i J_i dt}{EV} = \frac{\int X_i S_0 J_i dt}{EV}$$

$P_t$ : 在  $t$  時之產物濃度 ( mg glcN/ml )

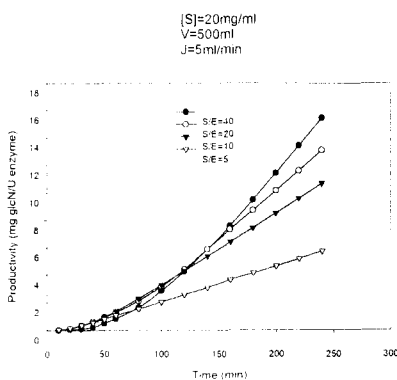
$X_t$ : 在  $t$  時之受質轉化率

$J_t$ : 在  $t$  時之透流率 ( ml/min )

對於批式反應槽，產能可以下式表示：

$$P_{\text{batch}} = \frac{XS_0}{E}$$

圖四顯示受質/酵素比對於產能的影響，產能隨著受質/酵素比的增加而增加，隨著操作時間的增加其產能之間的差距更大，由於連續式操作的特性，加入反應器的酵素量固定，而受質不斷加入反應槽，因此在重新充填或清洗前，操作時間越長產能越高。圖五表示滯留時間對於產能的影響，產能隨著滯留時間( $\theta$ )的增加而減少，隨著操作時間的增加其產能之間的差距更大。減少反應器體積或增加透流率可減少滯留時間，如此水解產物能很快的移出系統，使得產能增加。但過短的滯留時間可能導致受質反應不完全，造成膜的阻塞，使得可操作時間縮短。對於批式與連續式反應器其產能與體積更換( volume replacement )的關係如圖六所示，其中體積更換為產物體積除以反應體積。圖中連續式反應器的產能，是在固定透流壓力 35 kPa 下，長期操作 15 小時，隨著體積更換數目的增加，產能以線性的方式增加。對於批式反應器而言，產能為一個常數與體積更換無關，此乃由於批式反應每一次體積更換需要相同份量的酵素、受質與反應時間，才能得到相近的受質轉化率，因此每次更換時產能維持一定；而連續式操作只需要在第一次加入酵素，因此操作時間越長產能越大，與批式差異更多。由圖中可看出當體積更換數大於 2.5 時，連續式膜反應器的產能已高於批式，且隨著體積更換數的增加，差異越大。

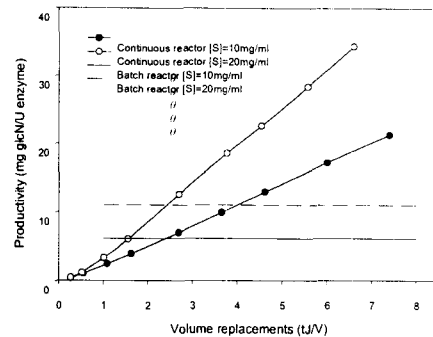


圖四、受質/酵素比例對產能的影響

Fig.4 Effect of substrate/enzyme ratio on productivity of the membrane reactor.

圖五、滯留時間對產能的影響

Fig.5 Effect of residence time on productivity of the membrane reactor.



圖六、批式與連續式操作產能之比較

Fig.6 Productivities of the batch and continuous reactors.

Batch reactor: [E]=1 unit/ml ; V=500 ml

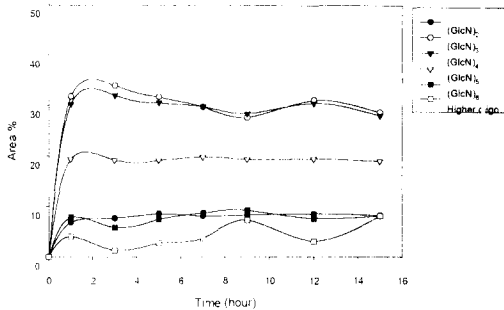
Continuous reactor : [E]=2 unit/ml ; V=500 ml

Transmembrane pressure=35 kPa

### 1. 膜反應器中長期操作下寡糖的組成變化

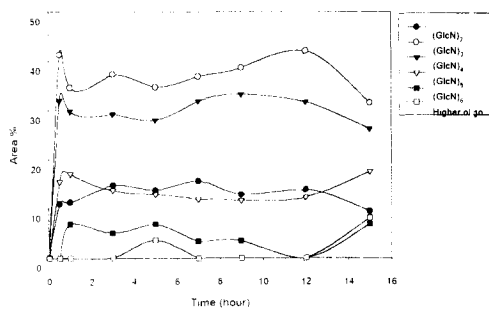
在膜反應器中長期操作下的產物組成變化如圖七與八所示。可看出以 *Bacillus cereus* NTU-FC-4 生產的粗酵素水解幾丁寡糖的主要產物為三糖與四糖。圖七為受質濃度 20 mg/ml；酵素濃度為 2 U/ml 條件下反應，在 15 小時長期操作下其產物的組成相當穩定。圖八為受質濃度 10 mg/ml；酵素濃度為 2 U/ml 條件下反應，則發現有轉糖的現象產生。如前所述，水解後的主要產物為三糖與四糖，因此推斷由 *Bacillus cereus* NTU-FC-4 生產的粗酵素其主要活性位置(active site) 為三糖與四糖，依勒沙特列原理所述，當反應平衡時，正反應的速率會等於逆反應，故當產物濃度高達某一程度時，會使反應向左，產生逆合成反應，以維持反應的平衡。由圖八可看出當三糖組成高於 40%，四糖組成高於 30%時，可能發生了轉糖現象，即三糖會接單糖、二糖、三糖或四糖而成為四糖、五糖、六糖或七糖；而四糖會接單糖、二糖、三糖或四糖而成為五糖、六糖、七糖或八糖，使得整個反應器中三糖與四糖的組成能維持在 30%左右，由圖八可看出水解 0.5 小時及 12 小時後都可發現此現象，即三糖、四糖的濃度達到轉糖反應所需的濃度時，開始轉糖，伴隨而來的即是二糖、三糖與四糖的組成減少，而五糖、六糖與高等寡糖

(higher sugar)的組成增加，使反應器中的三糖、四糖組成維持穩定。而陳(1995)在由 *Bacillus cereus* NTU-FC-4 生產的純化後的幾丁聚糖酶中也有發現類似的現象。



圖七、長期操作下幾丁寡糖的組成變化

Fig.7 The chito-oligosaccharides composition from membrane reactor as a function of time. System was operated at [S]=20 mg/ml ; [E]=2 unit/ml; V=500 ml ; transmembrane pressure=1.5 kPa.



圖八、長期操作下幾丁寡糖的組成變化

Fig.8 The chito-oligosaccharides composition from membrane as a function of time. System was operated at [S]=10 mg/ml ; [E]=2 unit/ml ; V=500 ml ; J=5 ml/min.

## 2. 操作變因對寡糖生產的影響

利用酵素膜反應器水解幾丁聚糖其透流液中產物組成如表一所示，在此並沒有把各個不同時間下產物的組成變化數據放上去。由於幾丁寡糖是利用膜反應器連續生產，因此當系統到達穩定狀態後，其組成即趨於穩定，亦即各糖之間的組成不因操作時間的增加而有顯著的變化，此乃連續生產的特點之一。因此表八的數據是於膜反應器中水解 4 小時後，透流液中的各種寡糖的組成。表中的寡糖轉化率是將透流液中二糖至六糖的濃度總和 (mg/ml) 除以進料的受質濃度 (mg/ml)，由寡糖所定義的轉化率高於利用還原糖所定義的轉化率，其原因

乃由於利用還原糖測法測定產物，則二糖以上的寡糖都算一個還原糖所致。因此利用高效能液相層析法測得的轉化率較符合實際情形。由表一可看出，隨著酵素濃度的增加，透流液中五糖與六糖的組成有減少的趨勢，二糖與三糖則有增加的趨勢，而四糖則沒有明顯的增加或減少的跡象，由此可看出反應器中存在過多的酵素會造成過度水解，而減少五糖與六糖的產量。

在低酵素濃度下 (0.5 U/ml)，隨著受質的增加，產物中五糖與六糖有增加的趨勢，但在受質濃度為 5 與 10 mg/ml 時，其寡糖轉化率約 70%，在受質濃度為 20 mg/ml 時，其寡糖轉化率僅有 30% 左右，顯示有受質累積的現象。但在高酵素濃度時，即系統中含有充足的酵素，受質濃度對於生產五糖六糖的影響則沒有像低酵素濃度時那麼顯著，此乃由於在高酵素濃度條件下，受質能充分的水解，因而使得受質濃度的影響變小。

在反應體積為 500 ml、透流率 5 ml/min 的條件下，酵素/受質比為 0.1 (unit/mg) 時，有較多的五糖與六糖生成，且也有較高的二糖至六糖轉化率。由於在討論較佳的酵素受質比時，並未考慮體積與透流率相互之影響，因此此較佳的酵素/受質比，只可適用於反應體積 500 ml、透流率為 5 ml/min 的條件下，大大的降低其實用性。在此可利用實驗所得的回歸式來分析，由於空間時間考慮了影響膜反應器的四個操作變因 (酵素濃度、受質濃度、反應體積與透流率)，因此可利用此回歸式求出空間時間對於還原糖轉化率開始不影響的點，此即為較佳的操作條件。當空間時間大於 10 時，還原糖轉化率即不受影響，此點即為較合適的操作點。

## 3. 連續式與批式反應器的比較

批式反應是在受質濃度 20 mg/ml; 酵素濃度 1 U/ml; 反應體積為 500 ml 條件下反應四小時，其組成在反應 160 分鐘後即無太大的變化。批式與連續式膜反應器的比較如表二所示，水解後的主要產物為三糖與四糖，因此推論，*Bacillus cereus* NTU-FC-4 生產的粗酵素主要的活性位置 (active site) 為三糖與四糖。連續式膜反應器的產物組成在四糖、五糖、六糖的組成百分比皆高於批式，而二糖與三糖則低於批式，由此結果推論，*Bacillus cereus* NTU-FC-4 生產的粗酵素在水解幾丁聚糖時，最初是以亂切的形式降解幾丁聚糖，此時有高於六糖的一級 (primary) 產物出現，最後再快速的將高於六

糖的一級產物切成二糖與四糖或兩個三糖。膜反應器由於是連續操作，產物連續被送出系統，故有較多的一級(primary)產物，而批式反應器的一級產物則留在反應器中繼續水解，而有較多的二糖與三糖。因此，連續式膜反應器較批式反應器適合生產高聚合度的寡糖。

Seino 等(1991)利用終端式反應槽(stirred cell)與批式反應器研究 *Bacillus sp.* PI-7S 生產的幾丁聚醣酶其性質與活性位置時，也與本研究有相同的發現。狀本(1989)指出，以幾丁聚醣酶水解幾丁聚醣，主要產物為二糖至六糖，單糖的量很少，隨著反應時間的增加，二糖與三糖有增加的趨勢。他亦指出以幾丁聚醣酶水解幾丁聚醣比幾丁質酶水解幾丁質容易生成寡糖，此乃由於幾丁質酶中含有 N-乙酰葡萄糖胺酶(N-Acetyl- $\beta$ -glucosaminidase)會將 N-乙酰幾丁二糖水解成單糖所致，因此幾丁聚醣酶較幾丁質酶有生產寡糖的潛力。

#### 四、計畫結果自評

幾丁質類的聚合物是一種數量龐大之廢棄物，且具有與其他物質結合的特性，這些物質提供了工業界開發研究具有經濟價值之新產品的機會。國內目前對蝦蟹外殼廢棄物之應用主要在於製造純化之幾丁質與幾丁聚醣，以供學術研究及工業用，至於其水解產物 - N-乙酰幾丁寡糖與幾丁寡糖的生產並不多見。以往主要靠幾丁質或幾丁聚醣於適當的條件下以酸水解產生這些寡糖，或是利用酵素水解在批式反應器下進行。本研究則是期望能改善以往生產幾丁寡糖的缺點，以連續式膜反應器製造幾丁寡糖，使其能連續的大量生產，使成本降低而有工業化的潛力。

本研究結果顯示，利用連續式膜反應器生產幾丁寡糖的優點有：

1. 產能高於批式反應器。
2. 可連續操作。
3. 高等寡糖的產量較批式高。
4. 產物品質較好且穩定，不需加熱使酵素失活，故沒有褐變現象。

操作條件方面值得特別強調的是，增加受質的滯留時間可增加產物濃度，但是當滯留時間高於某一程度時，產物濃度則不再增加。另外，在固定的酵素/受質比下，產物濃度與受質濃度是以等比例的方式增加，因此可藉由提升受質濃度來增加產物濃度。然而由於幾丁聚醣

在醋酸中約只能溶解 5% (w/v)，因此在膜反應器中利用受質濃度來提升產物濃度也有所限制。

當酵素濃度增加時，受質轉化率隨之增加，但操作容量減少。當受質濃度增加時，受質轉化率隨之減少，但操作容量增加。因此最適的酵素濃度與受質濃度需視是以最大轉化率或最大操作容量為目標而定。而在最適滯留時間方面，也是需視是以最大轉化率或最大操作容量為目標而定。在此若能考慮到經濟方面的因素，如酵素價格、產物價格等因素，則可得到有最大的經濟收益的受質轉化率與操作容量(此點並非最大受質轉化率或操作容量)。

同時，本研究發現以 *Bacillus cereus* NTU-FC-4 生產的粗酵素在長期操作下有相當良好的安定性，且其主要產物為寡糖。然而，即使利用膜反應器來生產寡糖，產物中仍然以三糖及四糖居多，而根據文獻，較具生理活性之寡糖為六、七及八糖。因此，後續之研究應朝如何增加高等寡糖之濃度的方向努力。

#### 五、參考文獻

- 王新穎。1994。在膜反應器中利用酵素水解酵母菌蛋白質與核酸。國立台灣大學食品科技研究所博士論文。
- 余哲禮。1996。利用膜反應器製備酪蛋白磷態。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。
- 李勳宜。1988。草蝦幾丁聚醣之製備及其應用之研究。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。
- 林翰良。1994。以固定化幾丁聚醣酶生產幾丁聚醣水解物及其抑菌之研究。東海大學食品科學研究所碩士論文。
- 洪啟章。1994。*Bacillus cereus* NTU-FC-4 菌株之幾丁質酶幾丁聚醣酶研究。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。
- 許美芳。1996。N-乙酰幾丁六糖的免疫效果。食品工業月刊，10: 38-45。
- 華宏達。1994。分子量、鏈柔軟度、化學修飾對幾丁聚醣超過濾特性的影響。國立台灣海洋大學水產食品科學研究所碩士論文。
- 陳榮輝，金曉珍。1995。水產甲殼類廢棄物開發高經濟價值之幾丁質、幾丁聚糖、幾丁寡糖研究之規劃報導。科學發展月刊，23(6): 550-562。
- 陳美菁。1995。*Bacillus cereus* NTU-FC-4 菌株幾丁聚醣酶之研究。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。
- 蔡政家。1996。以化學法由蝦殼製備幾丁質及幾丁聚醣之處理條件與反應動力學探討。國立台灣海洋大學水產食品科學研究所碩士論文。
- 劉淑瓊。1994。幾丁質幾丁聚醣及其相關酵素之特性與應用。食品工業，26(1): 26-36。

- 蘇南維。1995。 *Listonella damsela* NTU-FC-6 幾丁質酶之研究。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。
- 舩井和男。1989。キチンとキトサンオリゴ糖の開発と現状。 *New Food Industry*, 31(6):17-25。
- 島居義有，木元勝一，古賀勉，情野治良。1993。高級キトサンオリゴ糖及び高級キチンオリゴ糖の製造方法。特開平 5-68580。
- 野功夫。1992。幾丁質、脱乙酰幾丁質與幾丁質水解酶在日本之研究發展現況。 *生物産業*, 3(3, 4): 157-168。
- 塙上之，小原勝義。1990。キトサンの食品への應用。 *食品工業*, 30:25。
- 次塚慎一郎，崗智。1978。調味料およびそれを用いて調味した飲食物。昭 53-44664。
- Aiba, S. I. 1994. Preparation of N-acetylchitooligosaccharides from lysozymic hydrolysates of partially N-acetylated chitosans. *Carbohydrate Research*. 261:297-306.
- Adler-Nissen, J. 1976. Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J. Agric. Food. Chem.* 24(6):1090.
- Adamson, N. J. and Reynolds, E. C. 1995. Characterization of multiply phosphorylated peptides selectively precipitated from a pancreatic. *Biotechnol. Bioeng.* 45(3):196-204.
- Adamson, N. J. and Reynolds, E. C. 1995. Characterization of tryptic casein phosphopeptides prepared under industrially relevant conditions. *Biotech. Bioeng.* 45:196.
- Austin, P. R., Brine, C. J., Castle, J. E. and Zikakis, J. P. 1981. Chitin: New facets of research. *Science*. 212:749.
- Baker, S. A., Foster, A. B., Stacey, M. and Webber, J. M. 1958. Amino-sugars and related compounds. Part IV. Isolation and properties of oligosaccharides obtained by controlled fragmentation of chitin. *J. Chem. Soc.* 2218-2227.
- Birkhauser Verlag. 1992. What new in chitinase research? *Experientia*. 48:701-716.
- Bosso, C., Defaye, J., Domard, A., Gabelle, A. and Pedersen, C. 1986. The behavior of chitin towards anhydrous hydrogen fluoride. Preparation of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-linked 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosyl oligosaccharides. *Carbohydr. Res.* 156:57.
- Boucher, I., Dupuy, A., Vidal, P., Neugebauer, W. A. and Brzezinski, R. Purification and characterization of a chitosanase from *Streptomyces* N-174. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:188-193.
- Bough, W. A. 1975. Reduction of suspended solid in vegetable canning waste effluents by coagulation with chitosan. *J. Food Sci.* 40:297.
- Bough, W. A., Shewfelt, A. L. and Salter, W. L. 1975. Use of chitosan for the reduction and recovery of solids in poultry processing waste effluents. *Poultry Sci.* 54:992.
- Bouhallab, S., Molle, D. and Leonil, J. 1992. Tryptic hydrolysis of caseinomacropeptide in membrane reactor: preparation of bioactive peptides. *Biotech. Letters*. 14:805.
- Bouhallab, S., Molle, D. and Leonil, J. 1993. Continuous hydrolysis of  $\beta$ -casein in membrane reactor: Preparation of bioactive peptide. *Biotech. Letters*. 15:697.
- Brine, C. J. and Austin, P. R. 1981. Chitin variability with species and method of preparation. *Comp. Biochem. Physiol.* 68:283.
- Cheryan, M. and Mehaia, M. 1984. Ethanol production in a membrane recycle bioreactor conversion of glucose using *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem.* Dec:204.
- Cunningham, D. S., Carter, C. M. and Martil, K. F. 1975. Rupture and protein extraction of petroleum-grown yeast. *J. Food Sci.* 40:732.
- Deeslie, W. D. and Cheryan, M. 1981. Continuous enzymatic modification of proteins in ultrafiltration reactor. *J. Food Sci.* 46:1035.
- Deeslie, W. D. and Cheryan, M. 1981. A CSTR-Hollow fiber system for continuous hydrolysis of proteins. performance and kinetics. *Biotechnol. Bioengin.* p2257-2271.
- Deeslie, W. D. and Cheryan, M. 1981. 1988. Function properties of soy protein hydrolysates from continuous ultrafiltration reactor. *J. Agric. Food Chem.* 36:26-31.
- Fenton, D. and Everleigh D. E. 1981. Purification and mode of action of a chitosanase from *Penicillium islandicum*. *J. Gen. Microbiol.* 126: 151-165.
- Ferrer, J., Paez, G., Marmol, Z., Ramones, E., Garcia, H. and Forster, C. F. 1996. Acid hydrolysis of shrimp-shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolysate. *Bioresource Technology*. 57:55-60.
- Filar, L. J. and Wirick, M. G. 1978. Bulk and solution properties of chitosan In "Proceeding of the 1st Int. Conf. on chitin/chitosan." Eds. Muzzarelli, R. A. A. and Pariser, E. R. p169.
- Fogler, H. S. 1992. Elements of chemical reaction engineering. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Fukamizo, T., Honda, Y., Goto, S., Boucher, I. and Brzezinski, R. 1995. Reaction mechanism of chitosanase from *Streptomyces* sp. N.174. *J. Biochem.* 311: 377-383.
- Gauar, O., Aymard, C., Zakhya, N. and Rios, G. M. 1997. Kinetic studies on the hydrolysis of soluble and cassava starches by maltogenase. *Starch*. 49:231-237.
- Gardner, K. H. and Blackwell, J. 1975. Refinement of the structure of  $\beta$ -chitin. *Biopolymers*. 14:1581-1595.
- Grenier, J., Benhamou, N. and Asselin, A. 1991. Colloidal gold-complexed chitosanase: a new probe for ultrastructural localization of chitosan in fungi. *J.*

- Gen. Microbiol. 137:2007-2015.
- Guit, R. P. M., Kloosterman, M., Meindersma, G. W., Mayer, M. and Meijer, E. M. 1991. Lipase kinetics: hydrolysis of triacetin by lipase from *Candida cylindracea* in a hollow-fiber membrane reactor. *Biotechnol. Bioengin.* 38:727-732.
- Hedges, A. and Wolfe, R. S. 1974. Extracellular enzyme from *Myxobacter* AL-1 that exhibits both  $\beta$ -1,4-Glucanase and chitosanase activities. *J. Bacteriol.* p844-853.
- Hideto, U., Kiyotaka M., Yasuo. S. and Yutaka. O. 1990. Purification and some properties of extracellular chitinases from *Streptomyces* sp. S-84. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 36: 377-392.
- Hirano, S. 1990. Chitosan as an ingredient for domestic animal feeds. *American Chem. Society.* 38:1214.
- Horowitz, S. T., Roseman, S. and Blumenthal H. J. 1957. *J. Amer. Chem. Soc.* 79:5046.
- Huang, S. Y.; Lin, S. P. and Shen, M. L. 1997. Optimum operating conditions of bioreactor system for tryptic hydrolysis of ca-caseinate. *J. Chin. Inst. Chem. Engrs.*, 28(3): 217-228.
- Imoto, T. and Yagishita, K. 1971. A simple activity measurement of lysozyme. *Agric. Biol. Chem.* 35(7):1154.
- Inaba, T., Ohguchi, T., Iga, Y. and Hasegawa, E. 1984. Synthesis of 4-methylcoumarin-7-yl-oxy tetra-N-acetyl- $\beta$ -chitotetraoside, a novel synthetic substrate for the fluorometric assay of lysozyme. *Chem. Pharm. Bull.* 32(4):1597.
- Inui, H., Yoshida, M. and Hirano, S. 1996. Effects of a 6-O-hydroxyethyl group on the hydrolysis of 6-O-hydroxyethylchitin (Glycolchitin) by chitinase. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(11):1886-1887.
- Izume, M., Nagae, S., Kawagishi, H., Mitsutomi, M., and Ohtakara, A. 1992. Action pattern of *Bacillus* sp. 7-M chitosanase on partially N-acetylated chitosan. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56:448.
- Jahnel, J. B. Frimmel, F. H. 1996. Detection of glucosamine in the acid hydrolysis solution of humic substances. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 354: 8.
- Kapat, A., Rakshit, S. K. and Panda, T. 1996. Parameters optimization of chitin hydrolysis by *Trichoderma harzianum* chitinase under assay conditions. *Bioprocess Engineering.* 14:275-279.
- Kendra, D. F. and Hadwiger, L. A. 1984. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium Solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Experimental Mycology.* 8:276.
- Kienzle-sterzer, C. and Rha, C. K. 1985. Flow behavior of action biopolymer:chitosan. *Polymer bull.* 13:1.
- Kim, T. J., Lee, Y. D. and Kim, H.S. 1993. Enzymatic production of cyclodextrins from milled corn starch in an ultrafiltration membrane bioreactor. *Biotechnol. Bioengin.* 41:88-94.
- Knorr, D. 1982. Functional properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.* 47: 593-595.
- Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in food. *Food Technol.* 38:85.
- Kobayashi, M., Watanabe, T., Suzuki, S. and Suzukim, M. 1990. Effect of N-acetylchitohexaose against *Candida albicans* infection of tumor-bearing mice. *Microbiol. Immunol.* 34:413.
- Koga, D., Mizuki, K., Ide, A., Kono, M., Matsui, T. and Shimizu, C. 1990. Kinetics of a chitinase from a prawn, *Penaeus japonicus*. *Agric. Biol. Chem.* 54(10):2505-2512.
- Launay, B., Doublier, J. L. and Cuverlir, G. 1986. Flow properties of aqueous solution and dispersions of polysaccharides. In "Function properties of food macromolecules." Eds. Mitchell, J. R. and Ledward, D. A. Elsevier Applied Sci. Publishers:1.
- Marcotte, E. M.; Monzingo, A. F.; Ernst, S. R.; Brzezinski, R. and Robertus, J. D. 1996. X-ray structure of an anti-fungal chitosanase from *streptomyces* N 174. *Nature Structural Biology*, 3(2): 155-162.
- Michaels, A. S. 1980. Membrane technology and biotechnology. *Desalination.* 35:329.
- Mima, S., Miya, M., Iwamoto, R. and Yoshikawa, S. 1982. Highly deacetylated chitin and its properties. In *Chitin/Chitosan, Proceeding of 2<sup>nd</sup> Int. Conf. on Chitin and chitosan.* p21.
- Minke, R. and Blackwell, J. 1978. The structure of  $\alpha$ -chitin. *J. Mol. Biol.* 120:167.
- Minour, Y., Akira, U., Kuniko, S., Akikazu, A. and Takaaki, F. 1988. Purification and properties of chitosanase from *Bacillus circulans* MH-K1. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 34: 255-270.
- Moore, G. K. and Roberts, G. A. F. 1980. Determination of the N-acetylation of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2, April: 115.
- Mountzouris, K. C., Gilmour, A. S. and Rastall, R. A. 1999. Modeling of oligodextran production in an ultrafiltration stirred-cell membrane reactor. *Enzyme and Microbial Technology.* 24:75-85.
- Muraki, E., Yaku, F. and Kojima, H. 1993. Preparation and crystallization of D-glucosamine oligosaccharides with dp 6-8. *Carbohydrate Research.* 239:227-237.
- Muraki, M., Morikawa, M., Jigami, Y. and Tanaka, H. 1987. The roles of conserved aromatic amino-acid residues in the active site of human lysozyme: a site-specific mutagenesis study. *Biochimica et Biophysica Acta.* 916:66-75.
- Nakamura, A.; Maeda, M. and Kinoshita, T. 1969. Analytical chemical studies on amino sugars. I. New color reaction of hexosamines using *p*-nitrobenzaldehyde and tetraethylammonium hydroxide. *Chem. Pharm. Bull.*, 17(4):770-774.
- Nordtveit, R.; Vårum, K. M. and Smidsrud, O. 1994. Degradation of fully water-soluble, partially N-acetylated chitosans with lysozyme. *Carbohydrate*

- Polymers, 23: 253-250.
- Ofoli, R. Y., Morgan, R. G. and Steffe, J. F. 1987. A generalized rheologic model for inelastic fluid foods. *J. Texture studies*, 18:213-230.
- Okajima, S. and Ando, A. 1994. Purification and characterization of an extracellular chitosanase produced by *Amycolatopsis* sp. CsO-2. *J. Ferment. Bioeng.* 77:617-620.
- Okajima, S., Kinouchi, T., Mikami, Y. and Ando, A. 1995. Purification and some properties of a chitosanase of *Nocardioides* sp. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 41:351-357.
- Okazaki, K. and Tagawa, K. 1991. Purification and properties of chitosanase from *Streptomyces cinereoruber*. *J. Ferment. Bioeng.* 71(4):237-241.
- Osswald W. F., Shapiro, J. P., Doostdar, H., McDonald, R. E., Niedz, R. P., Nairn, C. J., Hearn, C. J. and Mayer, R. T. 1994. Identification and characterization of acidic hydrolase with chitinase and chitosanase activities from sweet orange callus tissue. *Plant Cell Physical.* 35(5):811-820.
- Ono, T., Ohotawa, T., Takagi, Y. and Ito, T. 1995. Preparation of casein phosphopeptides from casein micelles by ultrafiltration. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59:510.
- Palmer, T. 1995. *Understanding enzyme*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New York.
- Payne, R. E. and Hill, C. G. 1978. Enzymatic solubilization of leaf protein concentrate in membrane reactor. *J. Food Sci.* 43:385.
- Pelletier, A. and Sygusch, J. 1990. Purification and characterization of three chitosanase activities from *Bacillus megaterium* P1. *Applied and Environmental Microbiology*, p844-848.
- Porter, M. C. and Michaelis, A. S. 1972. Membrane ultrafiltration. Part 5. A useful adjunct for fermentation and enzymatic processing of food. *Chem. Tech.* 1(1):59.
- Predergast, K. 1974. Protein hydrolyzates-A review. *Food Trade review*, 44:16.
- Racki, D. V., Jonas, M., Wandrey, C., Hunmel, W. and Kula, M. R. 1989. Continuous (R)-mandelic acid production in an enzyme membrane reactor. *Applied Microbiology Biotechnology*, 31:215-222.
- Roby, D., Gadella, A. and Domszy, J. G. 1987. Chitin oligo-saccharides as elicitor of chitinase activity in melon plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143:885.
- Rosenberg, M. 1995. Current and future applications for membrane processes in the dairy industry. *Trends in Food science & Technology*, V6:12-19.
- Rupley, J. A. 1964. The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low molecular-weight substrates for lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta.* 83:245.
- Sakai, K., Uchiyama, T., Matahira, Y. and Naitojo, F. 1991. Immobilization of chitinolytic enzyme and continuous production of N-Acetylglucosamine with immobilized enzymes. *J. Ferment. Bioeng.* 72: 168-172.
- Samules, R. J. 1981. Solid state characterization of the structure of chitosan film. *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.* 19:1081.
- Sannan, T., Kurita, K. and Lwakura, Y. 1978. Studies on chitin I.R Spectroscopic determination of degree of deacetylation. *Polymer.* 19:458.
- Satory, M., Furlinger, M., Haltrich, D., Kulbe K. D., Pittner, F. and Nidetzky, 1997. Continuous enzymatic production of lactobionic acid using glucose-fructose oxidoreductase in an ultrafiltration membrane reactor. *Biotechnology letters*, 19: 1205-1208.
- Seino, H., Tsukuda, K. and Shimasue, Y. 1991. Properties and action pattern of a chitosanase from *Bacillus* sp. PI-7S. *Agric. Biol. Chem.* 55: 2424-2423.
- Shimosaka, M., Nogawa, M., Ohno, Y. and Okazaki, M. 1993. Chitosanase from the plant pathogenic fungus *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*-purification and some properties. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57(2):231-235.
- Sim, K. A. and Cheryan, M. 1992. Hydrolysis of liquefied corn starch in a membrane reactor. *Biotechnol. bioeng.* 39: 960-967.
- Sim, K. A. and Cheryan, M. 1992. Continuous saccharification of corn starch in a membrane reactor Part I :conversion, capacity and productivity. *Starch.* 44: 341-345.
- Sim, K. A. and Cheryan, M. 1992. Continuous saccharification of corn starch in a membrane reactor Part II :membrane performance and reactor stability. *Starch.* 44: 345-348.
- Slominska, L., Grajek, W., Grzeskowiak, A. and Gocalek, P. 1998. Enzymatic starch saccharification in an ultrafiltration membrane reactor. *Starch.* 9:390-396.
- Somashekar, D. and Joseph, R. 1992. Partial purification and properties of a novel chitosanase secreted by *Rhodotorula gracilis*. *Letters in Applied Microbiology.* 14:1-4.
- Strathmann, H. 1981. Membrane separation process. *J. Membrane Sci.* 9:121.
- Suzuki, S., Suzuki, K., Tokoro, A., Okawa, Y. and Suzuki, M. 1985. Immunopotentiating effects of N-acetylchito-oligosaccharides. In *Chitin in Nature and Technology*. Proceeding of the Third International Conference on Chitin and Chitosan, ed by Muzzarelli, R., p. 485-492. Plenum Press, New York.
- Suzuki, K., Midami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S. and Suzuki, M. 1986 a. Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydr. Res.* 151:403.
- Suzuki, K., Tokoro, A., Okawa, Y., Suzuki, S. and Suzuki, M. 1986 b. Effect of N-acetylchito-oligosaccharides



- on activation of phagocytes. *Microbiol. Immunol.* 30:777.
- Takayanagi, T., Ajisaka, K., Takiguchi, Y. and Shimahara, K. 1991. Isolation and characterization of thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* X7u. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1078:404-410.
- Terbojevich, M., Cosani, A. and Muzzarelli, R. A. A. 1996. Molecular parameters of chitosans depolymerized with the aid of papain. *Carbohydrate Polymers.* 29:63-68.
- Toei, K. and Kohara, T. 1976. A conductometric method for colloid titrations. *Analytica Chimica Acta.* 83:59.
- Tohura, A., Kobayashi, M., Tatewaki, N., Suzuki, K., Okawa, Y., Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. 1989. Protective effect of N-acetylchitohexaose on *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Microbiol. Immunol.* 33:357.
- Tominaga, Y. and Tsujisaka, Y. 1975. Purification and some enzymatic properties of the chitosanase from *Bacillus* R-4 which lyses *Rhizopus* cell walls. *Biochimica et Biophysica Acta.* 410:143-155.
- Ueno, H., Miyashita, K., Sawada, Y. and Oba, Y. 1990. Purification and some properties of extracellular chitinases from *Streptomyces* sp.S-84. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 36:377-392.
- Visser, S., Noorman, H. J., Slangen, C. J. and Rollema, H. S. 1989. Action of plasmin on bovine beta-casein in a membrane reactor. *J. Dairy Res.* 56:323
- Yabuki, M., Uchiyama, A., Suzuki, K., Ando, A. and Fujii, T. 1988. Purification and properties of chitosanase from *Bacillus circulans* MH-K1. 34:255-270. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 34:255-270.
- Yamasaki, Y., Fukumoto, I., Kumagai, N., Ohta, Y., Nakagawa, T., Kawamukai, M. and Matsuda, H. 1992. Continuous chitosan hydrolyzate production by immobilized chitosanolytic enzyme from *Enterobacter* sp. G-1. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 1546-1551.
- Yamasaki, Y., Hayashi, I., Ohta, Y., Nakagawa, T., Kawamukai, M. and Matsuda, H. 1993. Purification and mode of action of chitosanolytic enzyme from *Enterobacter* sp. G-1. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57(3): 444-449.
- Yalpani, M. and Pantaleone, D. 1994. An examination of the unusual susceptibilities of aminoglycan to enzymatic hydrolysis. *Carbohydrate Research.* 256:159-175.
- Yang, T. and Zall, R. B. 1984. Chitosan membrane for reverse osmosis application. *J. Food Sci.* 49:91.
- Yoshihara, K., Hosokawa, J., Kubo, T., Masahi, N. and Koba, Y. 1992. Purification and properties of a chitosanase from *Pseudomonas* sp. H-14. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56(6):972-973.
- Young, M. E.; Bell R. L. and Carroad, P. A. 1985. Kinetics of chitinase production. I. Chitin hydrolysis. *Biotech. Bioeng.* XXVII: 769-775.
- Van Der Berg, G. B. and Smolder, C. A. 1988. Flux decline in membrane process. *Filtration and Separation* March/April:115.
- Vårnum, K. M.; Holme, H. K.; Izume, M.; Stokke, B. T. and Smidsrud, O. 1996. Determination of enzymatic hydrolysis specificity of partially N-acetylated chitosans. *Bioch. Biophys. Acta,* 1291: 5-15.

表一、膜反應器操中不同作條件下的水解產物的組成分析

Table 1 Analysis of enzyme hydrolyzate from membrane reactor after operating for 4 hours at different conditions. V=500ml ; J=5ml/min.

Substrate concentration (mg/ml)	Enzyme concentration (unit/ml)	Content of GlcN-oligomers to total (GlcN) <sub>2</sub> -(GlcN) <sub>6</sub> production (wt%)					Total (GlcN) <sub>2</sub> -(GlcN) <sub>6</sub> (mg/ml)	Conversion (GlcN) <sub>2</sub> -(GlcN) <sub>6</sub> (%)
		(GlcN) <sub>2</sub>	(GlcN) <sub>3</sub>	(GlcN) <sub>4</sub>	(GlcN) <sub>5</sub>	(GlcN) <sub>6</sub>		
5	0.5	9.06	28.49	31.66	22.16	8.62	3.86	77.23
	1	12.14	33.99	33.84	20.04	0.00	4.29	85.72
	2	18.77	40.62	23.11	17.51	0.00	4.31	86.15
	4	22.75	43.23	34.02	0.00	0.00	3.43	68.60
10	0.5	20.48	25.20	23.57	21.52	9.22	7.33	73.35
	1	9.27	26.82	30.32	23.42	10.17	9.68	96.75
	2	16.70	34.85	29.48	11.63	7.34	9.99	99.86
	4	20.94	39.10	29.16	7.38	3.42	8.18	81.80
20	0.5	5.98	12.59	23.32	32.56	25.56	6.57	32.83
	1	11.23	29.79	30.22	20.30	8.46	14.98	74.90
	2	12.91	30.45	28.65	19.00	8.98	18.04	90.19
	4	19.22	38.67	30.94	6.08	5.10	17.00	84.99

表二、批式與連續式膜反應器中幾丁聚糖之水解產物的組成比較

Table 2 Composition of the chitosan hydrolyzates from batch and membrane reactors after 4 hours of operation.

	substrate concentration (mg/ml)	Content of GlcN-oligomers to total (GlcN) <sub>2</sub> -(GlcN) <sub>6</sub> production (wt%)					Total (GlcN) <sub>2</sub> -(GlcN) <sub>6</sub> (mg/ml)	Conversion (GlcN) <sub>2</sub> -(GlcN) <sub>6</sub> (%)
		(GlcN) <sub>2</sub>	(GlcN) <sub>3</sub>	(GlcN) <sub>4</sub>	(GlcN) <sub>5</sub>	(GlcN) <sub>6</sub>		
Batch reactor	10	14.97	30.10	28.01	17.18	9.74	9.87	98.70
	15	16.86	31.11	27.10	16.94	7.99	14.85	99.00
	20	17.79	28.12	26.49	18.59	9.01	19.87	99.35
membrane reactor	10	9.27	26.82	30.32	23.42	10.17	9.68	96.75
	15	6.73	17.95	30.73	29.34	15.24	11.25	75.00
	20	11.23	29.79	30.22	20.30	8.46	14.98	74.90

- (a) Batch reactor was operated at [E]=1U/ml;V=500ml  
 Membrane reactor was operated at [E]=1U/ml;V=500ml;J=5ml/min.